

## Le molybdène en biologie

### I. Rôle du molybdène dans les processus métaboliques

Par JEAN TAVLITZKI

Institut de Biologie Physico-Chimique; 13, rue Pierre-Curie, Paris (France)

#### I. Introduction

Retrouvant chez tous les êtres vivants les mêmes processus essentiels à leur fonctionnement, la biochimie nous donne une image très satisfaisante de l'unité du monde vivant. Qu'il s'agisse d'organismes animaux ou végétaux, qu'il s'agisse de bactéries, on y trouve en effet les mêmes constituants fondamentaux. Ce sont les mêmes voies qui sont suivies pour la synthèse et la dégradation de ces constituants, les mêmes cycles qui interviennent dans la production et l'utilisation de l'énergie, chaque étape étant catalysée par des systèmes enzymatiques où se retrouvent des cofacteurs communs: molécules organiques ou métaux. Bien qu'ils soient associés à de multiples réactions, certains de ces derniers sont pourtant plus spécifiquement en rapport, soit avec l'utilisation de l'énergie solaire, le magnésium dans la photosynthèse, soit avec le transfert des électrons au cours de la respiration, le fer, soit avec l'utilisation des sources d'azote, le molybdène.

Il est bien évident que ce n'est que pour les besoins de l'analyse que l'on est amené à mettre l'accent sur l'intérêt de telle ou telle substance. La cellule constitue un tout dont les activités sont intégrées de façon très précise et où toute hiérarchie ne peut-être qu'arbitraire. Cette réserve étant faite, il n'en reste pas moins que les êtres vivants dépendent de l'azote pour leur subsistance et que tout facteur qui intervient dans son utilisation se trouve du même coup assumer une importance capitale. Ainsi en est-il du molybdène.

Nous avons tenté dans la présente mise au point de dégager les grandes lignes de ce que nous savons actuellement du rôle biologique de cet élément, avant d'aborder les aspects plus techniques qui concernent plus particulièrement l'agronomie et qui seront étudiés dans une seconde partie. Cette primauté donnée aux résultats de la recherche fondamentale ne doit cependant pas faire oublier qu'ils ont souvent été obtenus à partir d'observations effectuées 'sur le terrain'. Si notre contribution peut rapprocher la recherche pure des applications pratiques, elle n'aura pas été inutile. Ajoutons que de nombreuses revues tant anglaises qu'américaines ont été consacrées à ce sujet mais qu'à notre connaissance il n'en existe pas de française: il y avait là une lacune à combler<sup>1</sup>.

#### II. Historique

L'importance biologique du molybdène ne fut réalisée qu'en 1930 quand BORTELS<sup>2</sup> découvrit que cet élément est essentiel à la fixation de l'azote de l'air par *Azotobacter chroococcum*: la multiplication des cellules ne s'effectue dans un milieu de culture dépourvu d'azote à l'état combiné que si des traces de molybdène y sont ajoutées. Les résultats de BORTELS, qui ont été confirmés et étendus par de nombreux auteurs<sup>3-5</sup> indiquaient que le molybdène est indispensable à la fixation de l'azote par une série d'espèces d'*Azotobacter*.

C'est également à BORTELS que l'on doit les premières indications sur le rôle du molybdène dans la fixation de l'azote par les Légumineuses<sup>6</sup>. Il montra en effet que la quantité d'azote fixée et la croissance du pois, du soja et du trèfle incarnat cultivés dans des milieux définis, sont accrues de façon remarquable quand les solutions nutritives sont additionnées de molybdène ou de vanadium. On a montré depuis que le molybdène est essentiel à la fixation de l'azote de l'air par les bactéries qui croissent en symbiose avec les plantes légumineuses<sup>6,7-9</sup> et en 1942 ANDERSON décelait des déficiences molybdiques chez les Légumineuses cultivées sur certains sols d'Australie<sup>10</sup>.

Le molybdène n'intervient pas que dans les processus de fixation de l'azote de l'air par *Azotobacter* et les bactéries symbiotiques des légumineuses. JENSEN<sup>11</sup> a en effet trouvé que certaines espèces de Clostridies requièrent la présence de cet élément pour proliférer en absence d'azote combiné et les expériences de

<sup>1</sup> Signalons la revue récente de VIGNOLI et DEFRETIN (Biologie médicale 52, 319 (1963)) qui traite plus spécialement du métabolisme du molybdène chez les animaux supérieurs et fait une large place à son étude toxicologique.

<sup>2</sup> H. BORTELS, Arch. Mikrobiol. 1, 333 (1930).

<sup>3</sup> L. BIRCH-HIRSCHFELD, Arch. Mikrobiol. 3, 341 (1932).

<sup>4</sup> C. K. HORNER et al., J. agr. Res. 65, 173 (1942).

<sup>5</sup> E. C. MULDER, Plant and Soil 1, 94 (1948).

<sup>6</sup> H. BORTELS, Arch. Mikrobiol. 8, 13 (1937).

<sup>7</sup> H. J. EVANS et al., Plant Physiol. 25, 555 (1950).

<sup>8</sup> H. L. JENSEN, Proc. Linn. Soc. N.S. Wales 70, 203 (1945).

<sup>9</sup> H. L. JENSEN, Proc. Linn. Soc. N.S. Wales, 72, 265 (1948).

<sup>10</sup> A. J. ANDERSON, J. Austr. Inst. agr. Sci. 8, 73 (1942).

<sup>11</sup> H. L. JENSEN, Proc. Linn. Soc. N.S. Wales 72, 73 (1947).

BORTELS<sup>12</sup>, de FOGG<sup>13</sup> et de WOLFE<sup>14</sup> indiquent qu'il est nécessaire à la fixation de l'azote par *Anabaena cylindrica*.

D'autre part les recherches de ces dernières années ont permis de constater que d'autres végétaux que les Légumineuses peuvent fixer l'azote et que le molybdène est indispensable à cette fixation. A titre d'exemple citons ici les travaux sur la fixation de l'azote par *Alnus glutinosa*<sup>15</sup> et par *Myrica gale*<sup>16</sup>. Le Tableau I emprunté à une revue récente<sup>17</sup> fournit la liste des organismes dont on sait actuellement qu'ils fixent l'azote, et qui requièrent le molybdène et le fer pour la fixation.

Le rôle biologique du molybdène ne se limite pas à celui qu'il joue dans le processus de fixation de l'azote. En 1936 STEINBERG<sup>18,19</sup> décrivit les résultats d'expériences effectuées à l'aide d'*Aspergillus niger*. Lorsque l'on cultive cet organisme sur un milieu contenant des nitrates comme source d'azote, l'absence de molybdène provoque une diminution considérable (96%) du rendement en mycélium. Par contre lorsque c'est l'ammoniaque qui constitue la source d'azote, l'absence de molybdène est pratiquement sans effet. Le fait que le molybdène est essentiel à l'utilisation des nitrates par *Aspergillus* a été confirmé ensuite par MULDER<sup>5</sup> et par NICHOLAS et al.<sup>20</sup>. STEINBERG suggéra que le besoin réduit en molybdène observé chez *Azotobacter* quand l'azote combiné est substitué à l'azote gazeux, et le fait qu'*Aspergillus* ne requiert pas cet élément lorsqu'il utilise l'azote de l'ammoniaque au lieu de l'azote de nitrate, pouvaient avoir une signification commune.

La découverte de STEINBERG stimula la recherche d'un rôle possible du molybdène pour la croissance des plantes supérieures et en 1939 ARNON et STOUT<sup>21</sup> réussissaient à produire des déficiences molybdiques chez la tomate tandis que PIPER<sup>22</sup> décrivait peu après des symptômes de cette même déficience dans l'avoine. Il a été montré depuis<sup>7,23-26</sup> que le molybdène est indispensable à de nombreuses espèces de plantes. On en trouvera ci-dessous l'énumération: le chou-fleur, le chou, la moutarde, le trèfle incarnat, la luzerne, le pois, le haricot, le riz, l'orge, le rutabaga, la betterave à sucre, le lin, le céleri, le radis, la carotte, la pomme de terre<sup>23,24,27</sup>, le citronnier<sup>28</sup> et le tabac<sup>26</sup>.

Il est généralement admis que les plantes supérieures sont semblables à *Aspergillus niger* en ce qu'elles requièrent des quantités beaucoup plus considérables de molybdène pour l'utilisation des nitrates que pour l'utilisation de composés plus réduits tels que l'urée ou l'ammoniaque<sup>28,29</sup>. Chez les plantes carencées les nitrates s'accumulent et la teneur en protéines est réduite<sup>5,7</sup>. De même il a été trouvé que la carence molybdique des algues provoque l'inhibition de la réduction des nitrates, l'accumulation de glucides et d'autres symptômes typiques d'un trouble du métabolisme azoté. Lorsque la source d'azote est constituée par l'ammoniaque ou l'urée on ne constate pas de besoin pour le molybdène<sup>30-32</sup> comme nous l'avons vu plus

haut. Ceci signifie que l'un des rôles du molybdène dans le métabolisme des végétaux doit être associé plus ou moins directement avec la réduction des nitrates et on verra plus loin qu'il en est bien ainsi.

Cependant il a été montré clairement que certaines plantes, en particulier le citronnier et le chou-fleur, requièrent le molybdène même lorsqu'elles sont cultivées sur d'autres sources d'azote que les nitrates; des modifications biochimiques profondes sont provoquées dans des tissus qui ne sont apparemment pas associés au métabolisme des nitrates et on peut en déduire que le molybdène est impliqué dans d'autres processus, qui restent à élucider.

Tableau I. Organismes fixant l'azote de l'air

Symbiotes	Aérobies		Anaérobies	
	Hétérotrophes	Photo-autotrophes	Hétérotrophes	Photo-autotrophes
Légumineuses	<i>Azotobacter</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Chromatium</i>
<i>Alnus</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Calothrix</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
<i>Elaeagnus</i>	<i>Nocardia</i>			
<i>Hippophaë</i>	<i>Pullularia</i>		<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Rhodomicrobium vannielii</i>
<i>Shepherdia</i>			<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Casuarina</i>			<i>Achromobacter</i>	<i>Chlorobium</i>
<i>Myrica</i>				<i>Methanobacterium</i>
<i>Coriaria</i>				
<i>Ceanothus</i>				

<sup>12</sup> H. BORTELS, Arch. Mikrobiol. 11, 155 (1940).

<sup>13</sup> G. E. FOGG, Ann. Bot. 13, 241 (1949).

<sup>14</sup> M. WOLFE, Ann. Bot. 18, 299 (1954).

<sup>15</sup> J. H. BECKING, Nature 192, 1204 (1961).

<sup>16</sup> G. BOND et E. J. HEWITT, Nature 190, 1033 (1961).

<sup>17</sup> L. E. MORTENSON, in *The Bacteria* (Ed. I. C. GUNSALES et R. Y. STANIER, Academic Press, New York 1962), vol. III, p. 119.

<sup>18</sup> R. A. STEINBERG, J. agr. Res. 52, 439 (1936).

<sup>19</sup> R. A. STEINBERG, J. agr. Res. 55, 891 (1937).

<sup>20</sup> D. J. D. NICHOLAS et al., J. biol. Chem. 207, 341 (1954).

<sup>21</sup> D. I. ARNON et P. R. STOUT, Plant Physiol. 14, 599 (1939).

<sup>22</sup> C. S. PIPER, J. Austr. Inst. agr. Sci. 6, 162 (1940).

<sup>23</sup> E. J. HEWITT et E. W. JONES, J. Pomol. Hort. Sci. 23, 254 (1947).

<sup>24</sup> E. J. HEWITT et E. W. JONES, Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta., Long Ashton, Bristol (1948), p. 81.

<sup>25</sup> W. R. MEAGHER et al., Plant Physiol. 27, 223 (1952).

<sup>26</sup> R. A. STEINBERG, Plant Physiol. 28, 319 (1953).

<sup>27</sup> E. J. HEWITT, Ann. Rev. Plant Physiol. 2, 25 (1951).

<sup>28</sup> A. P. VANSLOW et W. P. DATTA, Soil Sci. 67, 363 (1949).

<sup>29</sup> S. C. AGARWALA, Nature 169, 1099 (1952).

<sup>30</sup> D. I. ARNON et al., Physiol. Plant. 8, 538 (1955).

<sup>31</sup> J. B. WALKER, Arch. Biochem. Biophys. 46, 1 (1953).

<sup>32</sup> P. S. ICHIOKA et D. I. ARNON, Physiol. Plant. 8, 552 (1955).

III. Rôle du molybdène dans la réduction des nitrates

Les nitrates, qui constituent pour les plantes la source principale d'azote, sont formés par nitrification biologique de l'ammoniaque. Du fait de sa toxicité l'ammoniaque ne sert que rarement de source satisfaisante pour les plantes supérieures, et bien que les nitrites et les acides aminés puissent être utilisés, ils sont moins efficaces que les nitrates<sup>33</sup>.

Par contre les microorganismes utilisent plus fréquemment l'ammoniaque, source d'azote pour de nombreux champignons et bactéries qui ne peuvent utiliser aussi bien les nitrates. La suppression de l'assimilation des nitrates par l'ammoniaque est un phénomène répandu chez de nombreuses moisissures<sup>34</sup> et chez les algues<sup>35</sup> et il se pourrait qu'il ait une valeur adaptative dans les habitats naturels.

Quelques espèces de microorganismes utilisent les nitrates comme accepteurs finaux d'hydrogène mais ne l'utilisent pas plus avant comme source d'azote pour la croissance. Alors que les bactéries dénitrifiantes réduisent les nitrates jusqu'au stade N<sub>2</sub>, d'autres telles *Escherichia coli* et *Pseudomonas* les utilisent soit à la place d'oxygène comme oxydant, soit comme source d'azote quand nul autre composé azoté n'est fourni.

Depuis ces dernières années des recherches ont été entreprises sur l'isolement et l'étude des systèmes enzymatiques impliqués dans l'assimilation des nitrates chez les bactéries, les champignons et les plantes supérieures. Les travaux originaux ont été effectués à l'aide de microorganismes, en particulier de champignons. Les travaux comparatifs qui ont suivi ont permis de retrouver des systèmes semblables chez les végétaux supérieurs. Notons ici que la seule étude d'enzymes isolés ne suffit pas à fournir une image adéquate des voies physiologiques suivies et qu'il est nécessaire de comparer les informations fournies par ce type d'investigation aux résultats obtenus au cours d'autres expériences physiologiques.

Citons tout d'abord quelques revues consacrées au sujet qui nous préoccupe: celles de NASON<sup>36,37</sup>,

McELROY et SPENCER<sup>38</sup>, EVANS<sup>39</sup>, HEWITT<sup>40</sup> et NICHOLAS<sup>41-44</sup>.

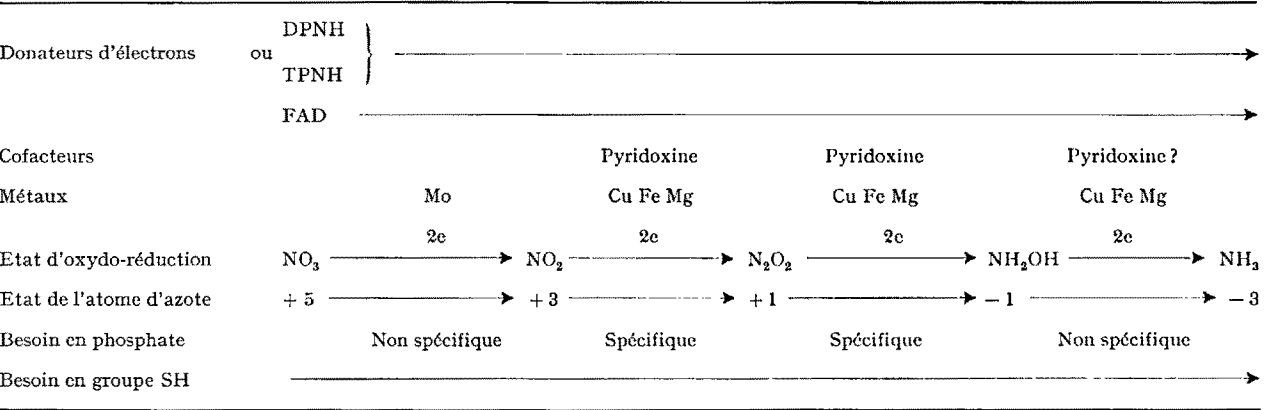
L'assimilation de l'azote des nitrates implique leur réduction jusqu'à l'ammoniaque, réduction qui a pour effet de faire passer l'état d'oxydation de l'atome d'azote de +5 à -3, soit un changement net de 8 électrons. Le Tableau II fait correspondre aux différents composés de l'azote ses états d'oxydo-réduction.

Tableau II

Composé	Formule		Etat d'oxydo-réduction de l'atome d'azote
Trioxyde d'azote	NO <sub>3</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	+6
Anhydride nitrique; acide nitrique	N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	HNO <sub>3</sub>	+5
Peroxyde d'azote	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	+4
Anhydride nitreux; acide nitreux	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	HNO <sub>2</sub>	+3
Oxyde nitrique; Oxyde nitreux; acide hyponitreux	NO	H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+2 +1
Azote	N <sub>2</sub>		0
Hydroxylamine	NH <sub>2</sub> OH		-1
Hydrazine	NH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>		-2
Ammoniaque	NH <sub>3</sub>		-3

<sup>33</sup> B. P. GHOSH et R. H. BURRIS, *Soil Sci.* **70**, 187 (1950).  
<sup>34</sup> A. G. MORTON et A. MACMILLAN, *J. exp. Bot.* **5**, 232 (1954).  
<sup>35</sup> M. CRAMER et J. MYERS, *J. gen. Physiol.* **32**, 93 (1948).  
<sup>36</sup> A. NASON, in *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ed. W. D. McELROY et B. GLASS; Johns Hopkins University Press, Baltimore 1956), p. 109.  
<sup>37</sup> A. NASON, *Bacteriol. Rev.* **26**, 16 (1962).  
<sup>38</sup> W. D. McELROY et O. SPENCER, in *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ed. W. D. McELROY et B. GLASS; Johns Hopkins University Press, Baltimore 1956), p. 137.  
<sup>39</sup> H. J. EVANS, *Soil Sci.* **81**, 199 (1956).  
<sup>40</sup> E. J. HEWITT, *Biol. Rev.* **34**, 333 (1959).  
<sup>41</sup> D. J. D. NICHOLAS, *J. Sci. Food Agr.* **8**, Suppl., 15 (1957).  
<sup>42</sup> D. J. D. NICHOLAS, *Ann. Bot.* **21**, 587 (1957).  
<sup>43</sup> D. J. D. NICHOLAS, in *Utilization of Nitrogen and its Compounds by Plants*. Symp. Soc. exp. Biol. (Academic Press, New York 1959), vol. XIII, p. 1.  
<sup>44</sup> D. J. D. NICHOLAS, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**, 63 (1961).

Tableau III. Etapes de la réduction des nitrates en ammoniaque

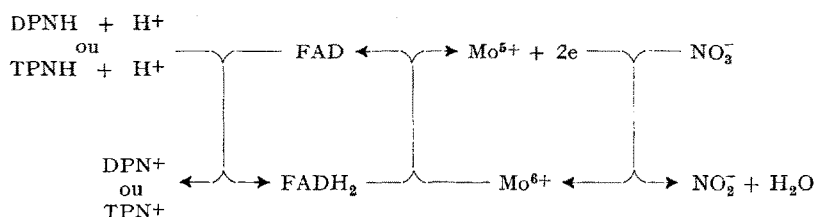


Les systèmes enzymatiques qui catalysent la réduction des nitrates en ammoniacque par l'intermédiaire des nitrites et de l'hydroxylamine ont été mis en évidence chez les bactéries, les champignons et les plantes.

Ce sont les nucléotides pyridiniques, diphospho et triphosphopyridine nucléotides réduits (DPNH et TPNH) qui jouent le rôle de donateurs d'électrons. La flavine-adénine dinucléotide (FAD) intervient dans le transfert des électrons et chaque étape de la réduction paraît être catalysée par un enzyme de nature métallo-flavoprotéique.

Les séquences principales qui mènent des nitrates à l'ammoniacque sont résumées dans le Tableau III emprunté à NICHOLAS<sup>43</sup>.

La première étape de cette séquence consiste donc en la formation de nitrite à partir de nitrate. C'est BURSTRÖM<sup>45</sup> qui le premier constata que les nitrates ajoutés à des homogénats de racines sont réduits par voie enzymatique mais il n'identifia pas les produits de la réduction. C'est ce que put faire DELWICHE<sup>46</sup> qui

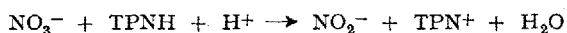


trouva que des extraits acellulaires obtenus à partir de racines et de feuilles réduisent les nitrates et les nitrites marqués à l'azote lourd  $^{15}\text{N}$ , jusqu'au stade de l'ammoniacque. Ce furent finalement EVANS<sup>47</sup> et NASON<sup>48</sup> qui isolèrent et purifièrent à partir de champignons et de plantes supérieures un enzyme de nature flavoprotéique qui catalyse la réduction des nitrates en nitrites.

Les donateurs d'électrons sont le TPNH pour les champignons, le DPNH pour les bactéries et l'un ou l'autre de ces coenzymes pour les plantes supérieures.

Il semble que dans tous les cas la flavine soit le FAD.

Les expériences ont montré que pour chaque molécule de TPNH oxydée il y a formation d'une molécule de nitrite, suivant l'équation:



L'activité de l'enzyme qui catalyse cette réaction est inhibée par les inhibiteurs des métaux et il revenait à NICHOLAS et al.<sup>20,49-52</sup> de démontrer que le molybdène est un composant spécifique et fonctionnel de l'enzyme. Ils montrèrent tout d'abord qu'au cours de la purification de l'enzyme, seul le molybdène, à l'exclusion des autres métaux, se trouve dans les fractions dont l'activité est la plus grande. En outre, le molybdène peut être séparé des fractions purifiées si on prend soin

de dialyser les préparations enzymatiques contre un mélange de cyanure et de glutathion. Or ces préparations dialysées, et dont le cyanure a été éliminé, sont incapables de catalyser la réduction des nitrates: l'addition au milieu d'incubation de molybdate de sodium ou de trioxyde de molybdène permet de retrouver 85% de l'activité des préparations non-dialysées. Aucun autre élément ne peut remplacer le molybdène.

EVANS<sup>53</sup> a confirmé ces résultats en étudiant la nitrate réductase extraite de feuilles de soja. Il a montré que le molybdène marqué à l'aide du radioisotope  $^{99}\text{Mo}$ , s'accumule dans les fractions dont l'activité est la plus élevée. L'utilisation de la même technique de dialyse que celle employée par NICHOLAS et NASON<sup>49</sup> lui permit de confirmer que le molybdène réactive l'apoenzyme.

NICHOLAS et NASON ont suggéré que le transfert des électrons catalysé par les nitrate-réductases extraites de *Neurospora crassa*, de quelques souches bactériennes, telles *Escherichia coli* et de plantes supérieures pourrait s'effectuer de la façon suivante:

Cette conception est en accord avec le fait que le DPNH peut être remplacé par un composé flavinique, FAD ou flavine-adénine-mononucléotide FMN, réduit ou par une solution de molybdate de sodium réduit par l'hydrosulfite. Ainsi, l'apport exogène de molybdène permet la réduction enzymatique du nitrate.

La séquence proposée est également en accord avec le fait que l'enzyme dialysé qui est pratiquement dépourvu de molybdène, est capable de catalyser la réduction du FAD par le DPNH, mais est incapable de catalyser la réduction des nitrates par le  $\text{FAD} \cdot \text{H}_2$  formé. Restait à déterminer, en particulier, l'état de valence du molybdène. La chromatographie sur papier de la solution de molybdate de sodium réduit par le dithionate permet de constater<sup>54,55</sup> que le composé

<sup>45</sup> H. BURSTRÖM, *Planta* **30**, 129 (1939).

<sup>46</sup> C. C. DELWICHE, *J. biol. Chem.* **189**, 167 (1951).

<sup>47</sup> H. J. EVANS et A. NASON, *Plant Physiol.* **28**, 233 (1953).

<sup>48</sup> A. NASON et H. J. EVANS, *J. biol. Chem.* **202**, 655 (1953).

<sup>49</sup> D. J. D. NICHOLAS et A. NASON, *J. biol. Chem.* **207**, 353 (1954).

<sup>50</sup> D. J. D. NICHOLAS et A. NASON, *J. biol. Chem.* **211**, 183 (1954).

<sup>51</sup> D. J. D. NICHOLAS et A. NASON, *Plant Physiol.* **30**, 135 (1955).

<sup>52</sup> D. J. D. NICHOLAS et A. NASON, *J. Bacteriol.* **69**, 580 (1955).

<sup>53</sup> H. J. EVANS et N. S. HALL, *Science* **122**, 922 (1955).

<sup>54</sup> D. J. D. NICHOLAS et H. M. STEVENS, *Nature* **176**, 1066 (1955).

<sup>55</sup> D. J. D. NICHOLAS et H. M. STEVENS, in *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ed. W. D. McELROY et B. GLASS, Johns Hopkins University Press, Baltimore 1956), p. 178.

molybdique dont l'état de valence est le plus réduit est le  $\text{Mo}^{5+}$ . Isolé des autres composés molybdiques par chromatographie sur colonne, le pentachlorure  $\text{Mo}^{5+}$  joue effectivement le rôle d'un donateur d'électrons efficace pour la réduction enzymatique des nitrates. D'autres états de valence du molybdène ont également été préparés. Ainsi le  $\text{Mo}^{4+}$  qui n'est stable que dans l'éthanol concentré et qui redonne facilement  $\text{Mo}^{5+}$  et  $\text{Mo}^{3+}$  en présence de traces d'eau. Il est par conséquent très improbable que le  $\text{Mo}^{4+}$  puisse être impliqué dans un processus physiologique quelconque. Quant à  $\text{Mo}^{3+}$ , préparé à partir de  $\text{Mo}^{6+}$  par réduction avec de la poudre de zinc, il réduit le nitrate en nitrite par un processus non-enzymatique. En outre  $\text{Mo}^{3+}$  est oxydé instantanément par  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$  que l'on trouve toujours dans les cellules de plantes, et le pouvoir réducteur de ces cellules est insuffisant pour effectuer la réduction de  $\text{Mo}^{6+}$  en  $\text{Mo}^{3+}$ .

Ainsi tout plaide en faveur de l'intervention de  $\text{Mo}^{6+}$  et  $\text{Mo}^{5+}$  et l'une des fonctions du molybdène de l'enzyme pourrait être de coupler la flavine au nitrate par changement d'un électron de  $\text{Mo}^{6+}$  à  $\text{Mo}^{5+}$  qui est ensuite réoxydé par le nitrate accepteur.

La nitrate-réductase requiert en outre la présence de phosphate qui peut être remplacé complètement par le tellurate, l'arsenate et le sélénate, et à un moindre degré par le silicate et le sulfate<sup>66</sup>. Il est possible que ces éléments puissent former des complexes avec le molybdène de l'enzyme car les rayons atomiques des anions de remplacement qui varient entre 2,4 et 2,8 Å sont du même ordre de grandeur que le rayon de l'atome de phosphore (2,76 Å). KINSKY et McELROY<sup>67</sup> ont montré que le phosphate est essentiel à l'action de la nitrate-réductase et qu'il accélère le transfert des électrons en se combinant au molybdène de l'enzyme.

Il importe maintenant de savoir si les enzymes mis en évidence dans les extraits de plantes ont ou non un rôle physiologique, sinon les recherches enzymatiques n'auraient que peu de valeur pour notre compréhension du métabolisme des nitrates.

Notons tout d'abord que la nitrate-réductase, caractérisée chez *Neurospora*, semble être largement distribuée. Des enzymes du même type ont en effet été mis en évidence chez les végétaux<sup>39, 51, 58-67</sup>, chez *Aspergillus niger*, chez la levure *Hansenula anomala*<sup>68</sup>, chez *Escherichia coli*<sup>52</sup> et dans les cellules de *Rhizobium* isolées des nodosités du soja<sup>69</sup>. Plus récemment CHENIAE et EVANS<sup>70</sup> ont inoculé des plantules de soja avec des cultures pures de *Rhizobium japonicum* et les ont cultivées aseptiquement en milieu dépourvu d'azote combiné. Ils ont constaté qu'il y a formation d'une nitrate-réductase active dans les nodosités bactériennes et que l'activité de cet enzyme dépend du molybdène. Il semble y avoir ici corrélation entre l'activité de la nitrate-réductase et la capacité de fixer l'azote.

Ces nitrate-réductases ne diffèrent entre elles que par leur spécificité vis-à-vis des nucléotides pyridiniques réduits et par la facilité avec laquelle la flavine peut être dissociée de l'apoenzyme. STOV<sup>71</sup> a trouvé que la riboflavine photoréduite est un donateur d'électrons efficace pour la réduction de nitrates catalysée par un enzyme extrait de feuilles de blé et purifié, et selon MEDINA et de HEREDIA<sup>72</sup>, la vitamine K pourrait jouer le rôle de transporteur d'électrons additionnel pour la réduction des nitrates chez *Escherichia coli*.

Ainsi cet enzyme est important du point de vue physiologique du fait qu'on le trouve chez de très nombreux organismes. Dans la plupart des cas il requiert le molybdène pour son fonctionnement et cet élément semble également nécessaire à sa formation. C'est ainsi que selon HEWITT et al.<sup>64, 65</sup> la nitrate-réductase peut être induite chez le chou-fleur et d'autres plantes carencées en molybdène quelques heures après qu'on ait procédé à l'infiltration de ce métal dans les feuilles. D'autre part on sait que les déficiences molybdiques provoquent chez les plantes l'accumulation de nitrates, une formation réduite d'acides aminés et une diminution de la synthèse de protéines. Parallèlement il y a réduction de l'activité de la nitrate-réductase<sup>5, 7, 73-75</sup>.

Enfin des recherches génétiques effectuées à l'aide de souches mutantes de *Neurospora* ont confirmé l'importance de cet enzyme: incapables de proliférer sur des milieux contenant des nitrates, les cellules de ces souches ne contiennent pas de nitrate-réductase.

Ajoutons pour terminer que la formation de l'enzyme chez *Neurospora* et *E. coli* requiert la présence de nitrates ou de nitrites dans le milieu de culture, la nitrate-réductase étant absente des organismes dont la seule source d'azote est constituée par l'ammoniaque. Il en est de même chez les plantes supérieures: la nitrate-réductase est induite par les nitrates dans les semences de riz<sup>66</sup>, chez le chou<sup>64</sup>, dans les embryons

<sup>50</sup> D. J. D. NICHOLAS et J. H. SCAWIN, *Nature* 178, 1474 (1956).

<sup>57</sup> S. KINSKY et W. D. McELROY, *Arch. Biochem. Biophys.* 73, 466 (1958).

<sup>58</sup> E. J. HEWITT et al., *Ann. Rept. Agr. Hort. Res. Sta., Long Ashton, Bristol* (1955), p. 202.

<sup>59</sup> W. F. ANACKER et V. STOV, *Biochem. Z.* 330, 141 (1958).

<sup>60</sup> R. H. HAGEMAN et D. FLESHER, *Plant Physiol.* 35, 700 (1960).

<sup>61</sup> K. OMACHI et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 46, 911 (1959).

<sup>62</sup> D. SPENCER, *Aust. J. biol. Sci.* 12, 181 (1959).

<sup>63</sup> C. S. VAIDYANATHAN et H. E. STREET, *Nature* 184, 531 (1959).

<sup>64</sup> M. I. CANDELA et al., *Plant Physiol.* 32, 280 (1957).

<sup>65</sup> E. J. HEWITT et M. M. R. K. AFRIDI, *Nature* 183, 57 (1959).

<sup>66</sup> P. TANG et H. J. WU, *Nature* 179, 1355 (1957).

<sup>67</sup> A. H. G. C. RIJVEN, *Aust. J. biol. Sci.* 11, 142 (1958).

<sup>68</sup> W. S. SILVER, *J. Bacteriol.* 73, 241 (1957).

<sup>69</sup> H. J. EVANS, *Plant Physiol.* 29, 298 (1954).

<sup>70</sup> G. M. CHENIAE et H. J. EVANS, *Biochim. biophys. Acta* 26, 654 (1957).

<sup>71</sup> V. STOV, *Biochim. biophys. Acta* 21, 395 (1956).

<sup>72</sup> A. MEDINA et C. F. DE HEREDIA, *Biochim. biophys. Acta* 28, 452 (1958).

<sup>73</sup> E. G. MULDER, *Lecuwenhoek ned. Tijdschr.* 6, 99 (1939).

<sup>74</sup> D. J. D. NICHOLAS, *J. Sci. Food Agr.* 11, 339 (1950).

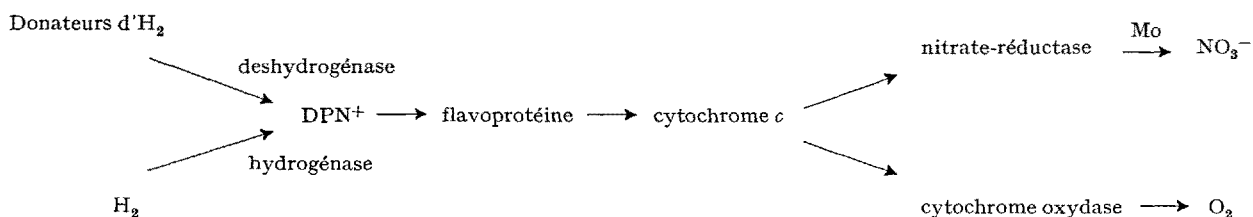
<sup>75</sup> E. J. HEWITT et E. W. BOLLE-JONES, *J. Hort. Sci.* 27, 257 (1952).

excisés de *Capsella bursa-pastoris* et du blé<sup>67</sup>, chez le maïs<sup>60</sup> et la tomate<sup>63</sup>.

Il a surtout été question jusqu'ici du rôle que joue le molybdène dans l'assimilation de l'azote des nitrates. Mais ce métal intervient aussi dans les processus de dissimilation et là aussi c'est la nitrate-réductase qui est en jeu. C'est ainsi que selon FEWSON et NICHOLAS<sup>76</sup>, la culture de *Pseudomonas aeruginosa* dans des milieux carencés en fer  $\text{Fe}^{2+}$  ou en molybdène  $\text{Mo}^{6+}$  conduit à l'obtention de cellules dont la teneur en nitrate-réductase est réduite. L'addition de ces métaux aux

peut proliférer en hétérotrophe ou en autotrophe en utilisant soit l'oxygène, soit les nitrates comme accepteurs terminaux d'électrons. La nitrate-réductase, qui dépend pour son fonctionnement du DPNH, n'est active que dans les cellules ayant proliféré en présence de molybdène et de nitrate, alors même que d'autres systèmes enzymatiques tels que ceux qui catalysent la respiration aérobie sont inactifs.

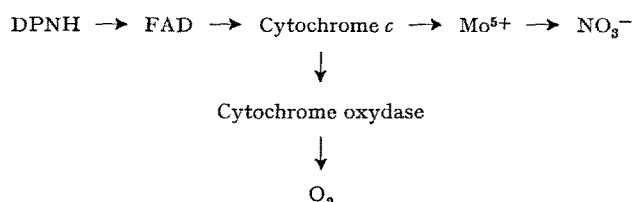
Les résultats de l'étude de FEWSON et NICHOLAS sur l'hydrogénase et sur la nitrate-réductase de *Micrococcus* les ont amenés à proposer le schéma suivant :



cellules carencées provoque un accroissement de l'activité enzymatique. Les auteurs ont également montré que les teneurs en molybdène, en fer et en cuivre des cellules cultivées dans des conditions de dénitrification sont supérieures à celles que l'on trouve dans les cellules cultivées en aérobiose. L'addition de fer, de molybdène ou de cytochrome *c* aux homogénats préparés à partir de cellules carencées est sans effet sur leur activité mais on peut constater qu'au cours de la purification de la nitrate-réductase, le molybdène et le fer sont concentrés dans les fractions les plus pures. L'enzyme purifié 115 fois à partir des extraits de cellules dénitrifiantes requiert le DPNH pour son fonctionnement et contient du FAD, du cytochrome *c* et du molybdène.

La nitrate-réductase purifiée permet d'obtenir des signaux de résonance paramagnétique électronique (ESR) après addition de DPNH et de nitrate. Ces signaux sont interprétés par les auteurs, et par analogie avec les résultats de BRAY et al.<sup>77,78</sup>, comme étant dus, l'un à la formation du radical libre semiquinone du FAD, l'autre à la forme réduite de  $\text{Mo}^{6+}$ . Les résultats indiquent donc qu'il y a production, au cours de la réduction des nitrates, d'une forme semiquinone libre du FAD, et que le molybdène lié à l'enzyme subit un changement de valence impliquant vraisemblablement  $\text{Mo}^{5+}$  et  $\text{Mo}^{6+}$ .

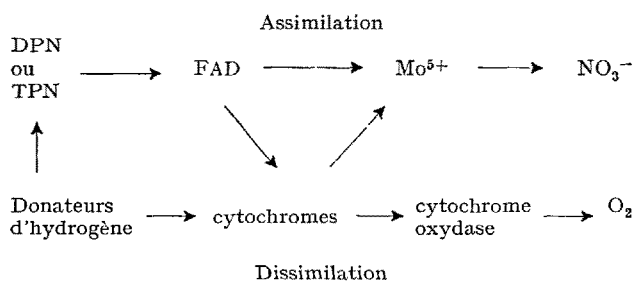
La séquence des électrons serait la suivante :



Des résultats similaires ont été obtenus par les mêmes auteurs sur *Micrococcus denitrificans*<sup>79</sup>, qui

Enfin des expériences récentes réalisées à l'aide de *Neurospora crassa* fournissent la même image<sup>80</sup>. Deux ou trois jours après l'ensemencement les hyphes mycéliens sont submergés et la croissance s'effectue en semi-aérobiose. Les nitrates sont alors métabolisés rapidement jusqu'au stade des nitrites qui s'accumulent dans le mycélium et dans le milieu. On peut à ce stade mettre en évidence une nitrate-réductase qui requiert le fer et le molybdène pour son activité. Au bout de 3 à 4 jours de croissance les hyphes deviennent aériens, la croissance est aérobie et les nitrites sont alors utilisés. A ce stade, seule la carence en molybdène a un effet le besoin en fer étant aboli.

L'essentiel des résultats obtenus peut être schématisé comme suit<sup>76</sup> :



Comme nous avons déjà eu l'occasion de le voir, la nitrate-réductase extraite de *E. coli* intervient dans la respiration des nitrates et non dans leur assimilation.

<sup>76</sup> C. A. FEWSON et D. J. D. NICHOLAS, Biochim. biophys. Acta 49, 335 (1961).

<sup>77</sup> R. C. BRAY et al., Biochem. J. 73, 193 (1959).

<sup>78</sup> R. C. BRAY et al., Biochem. J. 81, 178 (1961).

<sup>79</sup> C. A. FEWSON et D. J. D. NICHOLAS, Biochim. biophys. Acta 48, 208 (1961).

<sup>80</sup> G. C. WALKER et D. J. D. NICHOLAS, Nature 189, 141 (1961).

Elle est donc du type de celles que nous venons de décrire. TANIGUCHI et ITAGAKI<sup>81,82</sup> ont réussi à purifier cet enzyme et à l'obtenir dépourvu de flavine et de cytochrome  $b_1$ . Son poids moléculaire est de l'ordre du million et il contient 1 atome de molybdène et environ 40 atomes de fer liés par molécule. Selon IIDA et YAMASAKI<sup>83</sup> la nitrite-réductase extraite du même organisme contiendrait également du molybdène et du fer.

Si donc l'on compare les propriétés des nitrate-réductases qui interviennent dans l'assimilation des nitrates (type *Neurospora*) à celles des nitrates-réductases du type respiratoire (*E. coli*) on constate que les deux systèmes ont une caractéristique fondamentale commune: le molybdène fait partie de ces enzymes et est nécessaire à leur fonctionnement. Il apparaît ainsi que le molybdène est un composant nécessaire des enzymes qui catalysent la réduction des nitrates: nitrate-réductase de *Neurospora*, des plantes supérieures et de *E. coli* et, comme on le verra plus loin, de la xanthine-oxydase du lait et du foie, et de l'aldéhyde-oxydase.

Il a déjà été question de la nature inductible des nitrate-réductases du type *Neurospora*. PICHINOTY et D'ORNANO<sup>84,85</sup> ont montré que la formation de nitrate-réductase dans les cellules d'*Aerobacter aerogenes* anaérobie est également inductible et due à une synthèse *de novo* de l'enzyme à partir des amino-acides libres. La formation induite de l'enzyme par les nitrates ou les nitrites est stimulée par l'addition d'un hydrolysant de caséine et inhibée par le chloramphenicol. L'oxygène moléculaire inhibe à la fois l'activité de l'enzyme et sa formation ce qui confirme les données antérieures de POLLOCK obtenues à l'aide de *E. coli*<sup>86</sup>. Ceci est en accord avec le fait que la dénitrification est très faible en aérobiose.

#### IV. Rôle du molybdène dans la fixation de l'azote

On a vu dans la partie historique de cette revue que c'est à l'occasion de recherches effectuées à l'aide d'organismes fixant l'azote de l'air que le rôle biologique du molybdène a été découvert. Donnons à titre d'exemple les résultats obtenus par BOND et HEWITT<sup>16</sup>, sur *Myrica gale* cultivée en présence ou en absence de molybdène, en absence d'azote combiné. Après la formation des nodosités, la croissance des plantes cultivées en présence de molybdène est vigoureuse alors qu'elle est très nettement retardée lorsque cet élément n'est pas ajouté au milieu de culture: on constate alors des symptômes de déficience azotée, la taille des plantes étant réduite et les feuilles étant vert-pâle. Récoltées après le même temps de culture, les plantes ayant été cultivées en présence de molybdène ont une teneur en azote total de 15 mg par plante alors que la valeur correspondante pour les plantes carencées est de 3: la fixation de l'azote par les nodosités, où s'accumule le molybdène, est donc 5 fois plus efficace lorsque l'élément est présent.

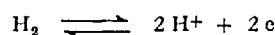
D'autre part les études biochimiques ont montré que chez *Azotobacter*, c'est l'ammoniaque qui est le produit de la fixation de l'azote et que cette substance sert de matériau de base pour la synthèse des acides aminés. En effet si *Azotobacter vinelandii* est exposé pendant un court instant, 13 à 15 min, à de l'azote contenant du <sup>15</sup>N, la plus grande partie de ce dernier se retrouve dans l'acide glutamique, la glutamine et l'acide aspartique<sup>87</sup>.

Il s'agit là, semble-t-il, d'un système général et les recherches effectuées à l'aide de préparations acellulaires permettent également d'obtenir de l'ammoniaque à partir de l'azote fixé, comme on le verra plus loin.

Le molybdène est seul à être spécifiquement et constamment associé au mécanisme de la fixation. C'est pourquoi l'élucidation du rôle exact qu'il joue dans ce processus ne peut précéder la compréhension du mécanisme de la fixation, mécanisme dont la nature est encore obscure.

Cependant les recherches de WILSON, BURRIS et al.<sup>88-90</sup> ont mis en évidence un certain nombre de faits qui sont non seulement en relation avec le mécanisme de la fixation de l'azote mais qui suggèrent également comment le molybdène y intervient.

Parmi les travaux qui ont précédé ces découvertes il convient de citer l'observation selon laquelle l'hydrogène moléculaire inhibe la fixation de l'azote par *Azotobacter*, *Nostoc* et le Trèfle rouge<sup>90</sup>. L'analyse de la nature de l'inhibition indiquait que l'hydrogène entre en compétition avec l'azote pour le centre actif d'un enzyme catalysant la fixation. Il avait été également établi que *Azotobacter*<sup>91</sup>, certaines espèces de Clostridies<sup>92</sup> et *Rhodospirillum rubrum*<sup>93</sup>, qui tous fixent l'azote, possèdent un enzyme qui active spécifiquement l'hydrogène suivant la réaction:



Cette hydrogénase n'a pas de spécificité quant à l'oxydant, les électrons pouvant être transférés à partir de  $\text{H}_2$  sur des colorants, le cytochrome  $c$ , les nitrates, les nucléotides pyridiniques, l'oxygène ou le ferri-

<sup>81</sup> S. TANIGUCHI et E. ITAGAKI, Biochim. biophys. Acta 31, 294 (1959).

<sup>82</sup> S. TANIGUCHI et E. ITAGAKI, Biochim. biophys. Acta 44, 263 (1960).

<sup>83</sup> K. IIDA et K. YAMASAKI, Biochim. biophys. Acta 44, 352 (1960).

<sup>84</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, C. r. Acad. Sci. 252, 793 (1961).

<sup>85</sup> F. PICHINOTY et L. D'ORNANO, Nature 191, 879 (1961).

<sup>86</sup> M. R. POLLOCK, in The Enzymes (Ed. P. D. BOYER, H. LARDY et K. MYRBÄCK; Academic Press, New York 1959), vol. I, p. 619.

<sup>87</sup> R. M. ALLISON et R. H. BURRIS, J. biol. Chem. 224, 351 (1957).

<sup>88</sup> P. W. WILSON et R. H. BURRIS, Bacteriol. Rev. 11, 41 (1947).

<sup>89</sup> P. W. WILSON, in Bacterial Physiology (Ed. C. W. WERKMAN et P. W. WILSON; Academic Press, New York 1951), p. 467.

<sup>90</sup> P. W. WILSON, Adv. Enzymol. 13, 345 (1952).

<sup>91</sup> S. B. LEE et al., J. biol. Chem. 144, 273 (1942).

<sup>92</sup> A. L. SHUG et al., J. Am. chem. Soc. 76, 3355 (1954).

<sup>93</sup> H. GEST, Bacteriol. Rev. 15, 183 (1951).

cyanure<sup>94, 95</sup>. Le fait que l'hydrogénase est inductible par l'azote plutôt que par l'hydrogène<sup>91</sup> suggère qu'elle était associée à la fixation de l'azote chez *Azotobacter*, hypothèse renforcée quand il fut trouvé que la concentration en hydrogénase est plus grande lorsque les cellules d'*Azotobacter* fixent activement l'azote<sup>96</sup>. Une étude plus récente<sup>97</sup> a permis de constater que l'activité hydrogénasique des cellules d'*Azotobacter* proliférant en présence d'azote combiné (chlorure d'ammonium ou nitrate de potassium) est beaucoup plus faible que chez les cellules fixant l'azote. D'autre part s'il y a une relation entre l'hydrogénase et la nitrogénase on doit s'attendre à ce que des cellules mutantes ayant perdu la capacité de fixer l'azote soient dépourvues d'hydrogénase, et c'est ce qui a été effectivement trouvé<sup>98</sup>.

L'association entre l'hydrogénase et le système fixant l'azote ressort également de ce que la photo-production d'hydrogène par des organismes des groupes *Athiorhodacea* et *Thiorhodaceae* est inhibée par l'azote et l'ammoniac et cette observation devait mener à établir que ces organismes sont capables de fixer l'azote<sup>93, 99, 100</sup>.

Pendant plusieurs années cependant le rôle de l'hydrogénase dans le processus de fixation de l'azote fut mis en doute du fait qu'il n'était pas possible de démontrer l'existence de cet enzyme dans les nodosités<sup>101</sup>. Il fut pourtant trouvé au cours d'expériences ultérieures<sup>102</sup> que des préparations faites à partir de nodosités du soja qui sont capables de fixer l'azote<sup>103</sup>, subissent une modification de leur spectre d'absorption quand on les met en présence d'hydrogène. Ceci indiquait donc que l'hydrogène doit jouer un rôle dans ce système symbiotique mais il fallut attendre les expériences de HOCH et al.<sup>104, 105</sup> pour que ce rôle soit précisé. Ces auteurs tentaient de déterminer si le deutérium D<sub>2</sub> peut être échangé avec l'hydrogène combiné pour fournir du HD. Ils trouvèrent qu'il en est bien ainsi mais qu'en outre il y a libération de H<sub>2</sub>. L'analyse détaillée de cette libération d'hydrogène montre qu'elle dépend de la présence d'oxygène, que les coupes obtenues à partir des nodosités sont beaucoup moins actives et les nodosités broyées complètement inactives, comportement semblable à ce qui se passe pour la fixation de l'azote. En outre la capacité qu'ont les nodosités de libérer de l'hydrogène va de pair avec leur capacité à fixer l'azote, et le système présente les mêmes caractéristiques que celles qui existent chez les microorganismes. C'est ainsi que l'azote inhibe la libération d'hydrogène, ce qui évoque le cas de bactéries photoréductrices<sup>93, 99, 100</sup>, et qu'il en est de même de l'oxyde nitreux N<sub>2</sub>O connu pour inhiber de façon compétitive la fixation de l'azote<sup>106</sup>. Par contre l'azote est requis pour la formation de HD à partir du deutérium et d'un donateur d'hydrogène alors que N<sub>2</sub>O qui inhibe et la libération d'hydrogène et la fixation d'azote, est sans action sur la réaction d'échange entre

le deutérium et l'hydrogène qui est complètement bloquée par le monoxyde de carbone. Tout se passe comme si l'azote était adsorbé à la surface de l'enzyme puis hydrogéné et que ce soit à ce niveau qu'ait lieu la réaction d'échange. Le monoxyde de carbone inhiberait cette hydrogénation, et par conséquent l'échange, en se liant au site actif qu'il bloquerait.

L'association entre l'hydrogénase et la nitrogénase, si bien mise en évidence chez les microorganismes, se retrouve donc dans les nodosités du soja ce qui permet de conclure que l'hydrogénase joue un rôle dans le processus de fixation de l'azote.

Les recherches effectuées dans ce domaine ont pris un aspect nouveau depuis qu'il est possible d'étudier la fixation de l'azote par des systèmes acellulaires<sup>17, 107</sup>. Les premiers résultats vraiment convaincants sont dus à CARNAHAN et al. utilisant des extraits obtenus à partir de *Clostridium pasteurianum*<sup>108, 109</sup> et les résultats ont été rapidement confirmés tant sur le même organisme<sup>110</sup> que chez *Rhodospirillum rubrum* et *Mastigocladus laminosus*<sup>110, 111</sup>. On a décrit aussi la fixation de l'azote par des extraits acellulaires d'autres organismes tels que *Azotobacter vinelandii*<sup>112</sup>, *Bacillus polymyxa*<sup>113</sup> et *Chromatium*<sup>114</sup>.

Les propriétés du système de fixation ont été particulièrement étudiées à l'aide d'extraits de *C. pasteurianum*. Ces extraits ne fixent rapidement l'azote qu'en présence de pyruvate. Il s'agit d'un processus complexe puisqu'il implique la dégradation phosphoroclastique du pyruvate où intervient le fer, le manganèse ou le magnésium, le pyrophosphate de thiamine, le phosphore et le coenzyme A; la flavine-adenine-dinucléotide, un dérivé de la vitamine B<sub>12</sub> et la biotine semblent également être nécessaires à cette réaction. De tous ces composants seul le coenzyme A accroît la vitesse de fixation; les autres substances se trouvent probablement en quantités non-limitantes.

<sup>94</sup> A. L. SHUG et al., in *Inorganic Nitrogen Metabolism* (Ed. W. D. McELROY et B. GLASS; Johns Hopkins University Press, Baltimore 1956), p. 344.

<sup>95</sup> J. B. WILSON et al., *J. biol. Chem.* **144**, 265 (1942).

<sup>96</sup> S. B. LEE et P. W. WILSON, *J. biol. Chem.* **151**, 377 (1943).

<sup>97</sup> M. GREEN et P. W. WILSON, *J. Bacteriol.* **65**, 511 (1953).

<sup>98</sup> M. GREEN et al., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **82**, 361 (1953).

<sup>99</sup> M. D. KAMEN et H. GEST, *Science* **109**, 560 (1949).

<sup>100</sup> H. GEST et al., *J. biol. Chem.* **182**, 153 (1950).

<sup>101</sup> P. W. WILSON et al., *J. biol. Chem.* **147**, 475 (1943).

<sup>102</sup> P. W. WILSON, *Science* **123**, 676 (1956).

<sup>103</sup> M. H. APRISON et R. H. BURRIS, *Science* **115**, 264 (1952).

<sup>104</sup> G. E. HOCH et al., *Nature* **179**, 430 (1957).

<sup>105</sup> G. E. HOCH et al., *Biochim. biophys. Acta* **37**, 273 (1960).

<sup>106</sup> R. REPASKE et P. W. WILSON, *J. Am. chem. Soc.* **74**, 3101 (1952).

<sup>107</sup> L. E. MORTENSON et al., *Bacteriol. Rev.* **26**, 42 (1962).

<sup>108</sup> J. E. CARNAHAN et al., *Biochim. biophys. Acta* **38**, 188 (1960).

<sup>109</sup> J. E. CARNAHAN et al., *Biochim. biophys. Acta* **44**, 520 (1960).

<sup>110</sup> K. C. SCHNEIDER et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **46**, 726 (1960).

<sup>111</sup> R. H. BURRIS et L. C. WANG, *Plant Physiol.* **35**, Suppl. XI (1960).

<sup>112</sup> D. J. D. NICHOLAS et D. J. FISCHER, *Nature* **186**, 735 (1960).

<sup>113</sup> F. H. GRAU et P. W. WILSON, *Bacteriological Proceedings* (1961), p. 193.

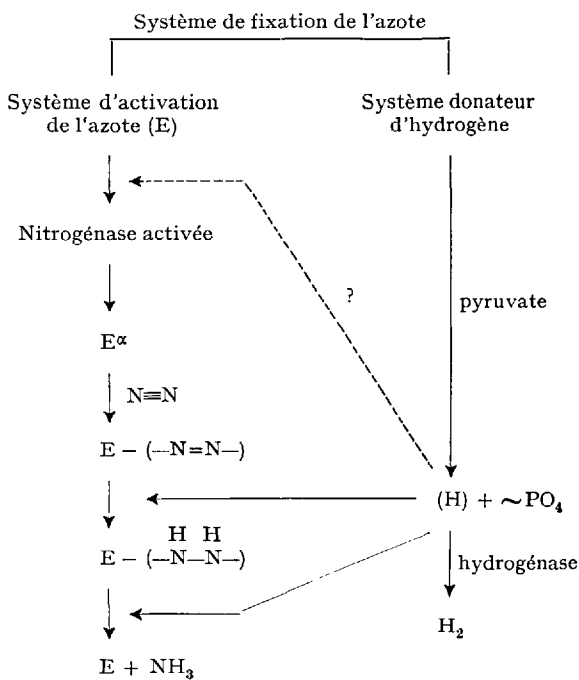
<sup>114</sup> D. I. ARNON et al., *Biochem. J.* **77**, 23 p (1960).



D'autres corps dont on sait qu'ils sont requis par les cellules entières pour fixer l'azote, tels le fer, le molybdène et le calcium n'ont pas d'effet. Eux aussi doivent se trouver en quantité suffisante dans les préparations. Effectivement même après avoir été dialysées contre un agent chélateur, les protéines de l'extrait contiennent encore du molybdène, du fer et du calcium.

Le système étudié catalyse la formation de  $\text{NH}_3$  à partir de  $\text{N}_2$  mais jusqu'à présent il n'a pas été possible d'isoler les intermédiaires qui se forment au cours des réactions. Par contre la purification des extraits enzymatiques a déjà permis d'obtenir deux fractions qui sont toutes deux requises pour la fixation mais dont l'une contient les enzymes pour la conversion du pyruvate en acétylphosphate,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ : c'est le système donateur d'hydrogène, alors que l'autre ne catalyse pas la dégradation du pyruvate: c'est le système activant l'azote<sup>17,107,115</sup>. L'analyse de la fraction qui catalyse la dégradation du pyruvate permet d'en isoler une protéine, la ferredoxine, qui joue le rôle d'intermédiaire entre la deshydrogénase de l'acide pyruvique et l'hydrogénase<sup>116</sup>. Cette protéine stimule fortement la production d'hydrogène à partir de l'acide pyruvique mais il n'est pas certain qu'elle couple directement la réaction phosphoroclastique aux réactions qui mènent à la fixation de l'azote.

L'ensemble des données actuelles peut être schématisé de la façon suivante<sup>17</sup>:

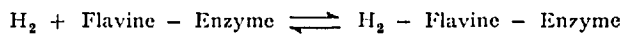


Il ne fait pas de doute que la possibilité d'étudier la fixation de l'azote à l'aide de systèmes acellulaires constitue un pas décisif pour notre compréhension du mécanisme de ce processus. On peut s'attendre à ce que des progrès rapides soient faits dans ce domaine tant

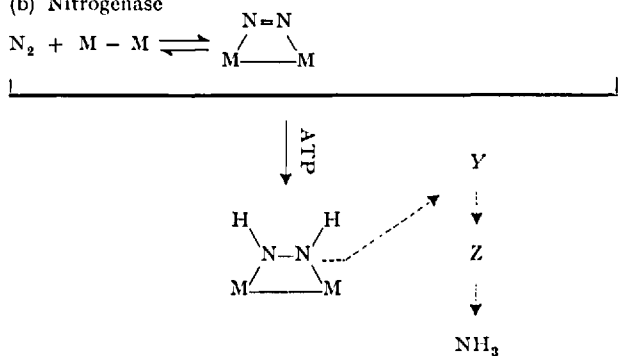
en ce qui concerne la nature des produits intermédiaires entre l'azote atmosphérique et l'ammoniaque qu'en ce qui concerne les enzymes et les cofacteurs qui y participent. Les résultats de ces études nous permettront de faire un choix entre les divers schémas de mécanismes qui ont été proposés jusqu'ici et que nous allons décrire brièvement maintenant.

Selon SHUG tout d'abord<sup>94</sup> l'hydrogénase serait une flavoprotéine dont l'action serait couplée à la réduction de l'azote adsorbé:

(a) Hydrogénase

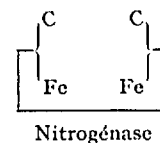


(b) Nitrogénase



En présence d'acide adénosine triphosphorique (ATP) fournisseur d'énergie il y aurait formation d'un composé hydrogéné de l'azote couplé aux métaux (M), composé qui fournirait finalement de l'ammoniaque. Les métaux impliqués seraient le fer et le molybdène. L'hypothèse de la nature flavoprotéique de l'hydrogénase repose sur le fait que l'enzyme purifié contient un composé flavinique et qu'il y a réduction lorsque cet enzyme est mis en présence d'azote. Le couplage entre l'hydrogénase et la nitrogénase rendrait compte des différences observées dans le spectre d'absorption d'une préparation enzymatique non purifiée obtenue à partir de cellules de *Clostridium pasteurianum*.

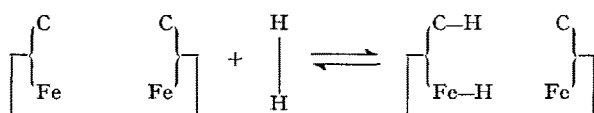
Pour WINFIELD<sup>17</sup> la nitrogénase serait un enzyme à plusieurs fonctions et qui pourrait réagir tant avec l'azote qu'avec l'hydrogène, l'oxygène et le gaz carbonique. Elle serait constituée de deux groupes à activité hydrogénasique se faisant face et maintenus par la protéine:



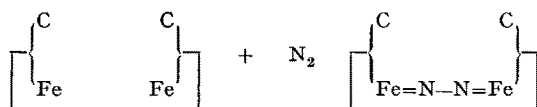
<sup>115</sup> L. E. MORTENSON, Fed. Proc. 20, 234 (1961).

<sup>116</sup> L. E. MORTENSON et al., Biochem. biophys. Res. Comm. 7, 448 (1962).

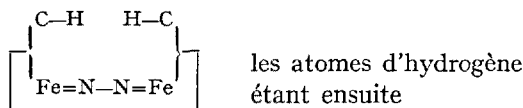
L'hydrogène, l'oxygène ou le monoxyde de carbone pourrait réagir avec l'un quelconque des groupes prosthétiques:



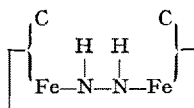
alors que l'azote réagirait avec les deux. Dans le processus de fixation de l'azote il y aurait donc tout d'abord adsorption de l'azote selon la réaction suivante:



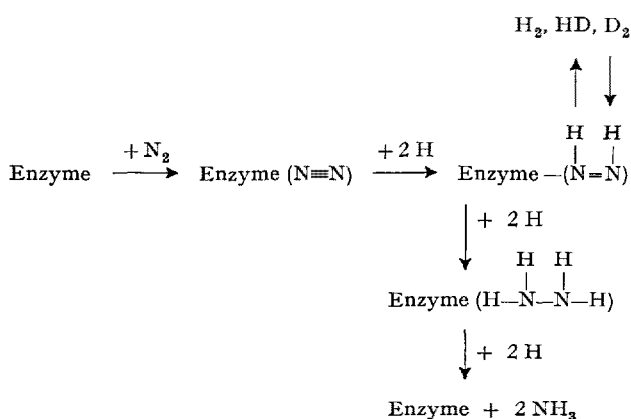
Le composé formé serait réduit par le système donneur d'hydrogène et donnerait un système du type:



transférés sur les atomes d'azote pour donner:



Rappelons que HOCH<sup>104, 105</sup> a trouvé que l'azote inhibe la libération de l'hydrogène par les nodosités du soja ce qui indique que l'azote et l'hydrogène sont en compétition pour le même site enzymatique et que la réaction d'échange entre D<sub>2</sub> et H dépend de la présence de N<sub>2</sub> ce qui suggère que l'échange pourrait se faire au niveau de la molécule d'azote liée à l'enzyme. On voit que ces observations sont en accord avec le schéma proposé par WINFIELD. On retrouvera d'ailleurs dans une partie du modèle proposé par HOCH des traits communs à celui du modèle de WINFIELD.



par HOCH, ceux-ci par contre ne rendent pas compte en particulier du fait que le molybdène est requis pour la fixation. Nous savons que cet élément est indispensable mais nous ignorons à quel niveau, à quel stade du processus de fixation et de conversion de l'azote atmosphérique il intervient. Est-ce au cours de l'adsorption de l'azote, au cours de processus de transfert des électrons qui aboutissent à la réduction de l'azote, ou dans le métabolisme glucidique qui lui est associé?

Les expériences que l'on peut effectuer maintenant à l'aide de préparations acellulaires devraient permettre de répondre à ces questions. Cette façon de voir est confirmée par les résultats obtenus dans l'analyse des signaux de résonance paramagnétique électronique. NICHOLAS et al.<sup>117, 118</sup> ont préparé à partir de cellules d'*Azotobacter* ayant proliféré en absence d'azote combiné, des particules qui fixent l'azote de l'air. Les propriétés de ces particules ont été comparées aux propriétés de celles que l'on extrait de cellules cultivées en présence d'un sel d'ammonium, et qui elles sont dépourvues d'activité.

Les particules qui fixent l'azote fournissent à 1,97 gauss, un signal d'autant plus intense que la fixation est plus active. Rappelons que la nitrate-réductase de *Pseudomonas*<sup>76</sup> et la xanthine-oxydase<sup>77, 78</sup> donnent un signal semblable. Il en est de même pour l'aldéhyde-oxydase<sup>119</sup>. Dans chacun de ces cas le signal est probablement associé à la présence de Mo<sup>5+</sup> et il disparaît après oxydation ou après réduction plus poussée. Or les mêmes causes ont les mêmes effets sur le signal obtenu avec les particules d'*Azotobacter* ce qui suggère qu'il est dû, là aussi, au Mo<sup>5+</sup>.

Lorsque de telles particules sont soumises à un courant d'hydrogène et qu'on leur ajoute un facteur, non-identifié, du milieu de culture, on constate qu'il y a augmentation de l'intensité des signaux dus au fer hémunique et non-hémunique. Corrélativement les cytochromes sont réduits. Leur réoxydation partielle peut être obtenue si les particules traitées par l'hydrogène, sont ensuite soumises à un courant d'azote, l'hélium étant dépourvu d'action.

Ces résultats suggèrent que les transporteurs d'électrons des particules fixant l'azote sont réduits par l'hydrogène et le ou les facteurs du milieu de culture. En un point de la chaîne de transfert des électrons, à proximité du fer non-hémunique et du molybdène les électrons sont dirigés vers l'azote, au lieu de l'être vers l'oxygène. Le processus serait analogue à celui qui fait intervenir les changements de valence de Mo<sup>6+</sup> à Mo<sup>5+</sup> dans le couplage du transfert des électrons à la réduction des nitrates. S'il en était ainsi le molybdène interviendrait par conséquent au cours des processus de

<sup>117</sup> D. J. D. NICHOLAS et al., *Nature* 196, 433 (1962).

<sup>118</sup> D. J. D. NICHOLAS, *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 13, 92 (1963).

<sup>119</sup> R. RAJAGOPALEN et al., *Biochem. biophys. Res. Comm.* 8, 220 (1962).

Il est à remarquer que si les données actuelles sont en accord avec les modèles proposés par WINFIELD et

transfert des électrons qui aboutissent à la réduction de l'azote après que ce dernier ait été adsorbé.

Pour si intéressantes qu'elles soient on voit que ces données sont encore trop fragmentaires pour permettre de conclure au rôle exact que joue le molybdène dans les processus de fixation de l'azote.

#### V. Rôle du molybdène dans d'autres processus biochimiques

Il ne fait pas de doute, comme nous l'avons déjà dit, que le molybdène intervient dans d'autres processus biochimiques que ceux qui sont en rapport avec la réduction de nitrates et la fixation de l'azote. Tant chez les végétaux que chez les animaux cet élément est en effet associé à divers systèmes que nous allons décrire brièvement.

AGARWALA<sup>29</sup> a constaté que le chou-fleur cultivé sur diverses sources d'azote dont l'urée et le sulfate d'ammonium, développe des symptômes de carence en molybdène et contient des quantités réduites d'acide ascorbique lorsque le milieu est déficient en molybdène. De même le citronnier requiert la présence de molybdène quand on le cultive sur des milieux où l'azote est sous forme d'ammoniaque<sup>28</sup>. HEWITT<sup>27</sup> a noté que chez de nombreuses espèces les déficiences molybdiques provoquent la diminution de la teneur en vitamine C. Le molybdène intervient-il directement dans la synthèse de l'acide ascorbique, constitue-t-il le groupement prosthétique d'un enzyme impliqué dans la chaîne des réactions, ou s'agit-il d'une action indirecte ? Il semble difficile pour l'instant de conclure.

Selon EVANS<sup>7</sup> la capacité de réduire le bleu de méthylène qu'ont les extraits de feuilles de luzerne est diminuée lorsqu'il y a déficience molybdique. Il en est de même de la réduction du triphényltétrazolum pour de nombreuses espèces végétales<sup>120</sup>. Ces relations suggèrent que le molybdène pourrait jouer un rôle, direct ou indirect, dans les transferts d'électrons autres que ceux qui intéressent la réduction des nitrates et la fixation de l'azote.

Nous avons à examiner maintenant les résultats de certains travaux qui indiquent qu'il pourrait y avoir un lien entre le métabolisme du phosphore et le molybdène. C'est ainsi que SPENCER<sup>121</sup> a fait remarquer que cet élément est un inhibiteur compétitif des phosphatases acides de la tomate. Il suggère que la concentration en molybdène normalement trouvée chez les plantes est suffisante pour inhiber les réactions phosphatasiques. Il se pourrait donc selon cet auteur, qu'une carence en molybdène ait pour effet de provoquer l'apparition d'une activité phosphatasique excessive. Il s'en suivrait une diminution de la quantité de métabolites phosphorylés ce qui affecterait indirectement la synthèse d'acide ascorbique. Cette hypothèse rendrait compte du besoin en molybdène des plantes cultivées en présence d'ammoniaque.

Ce point de vue n'est pas partagé par HEWITT<sup>40</sup> car la concentration en molybdène des plantes normales est trop faible pour qu'une action sur les phosphatases alcalines puisse être notable. En outre on n'observe aucun effet du molybdène sur la phosphatase acide lorsque les feuilles sont soumises à l'infiltration d'une solution de cet élément.

POSSINGHAM<sup>122</sup> a également provoqué des déficiences molybdiques chez la tomate et il a étudié les variations du phosphore organique et du phosphore inorganique chez des plantes carencées et chez des plantes traitées par le molybdène. Il a constaté que le rapport entre ces deux formes décroît de façon marquée chez les plantes carencées et que l'addition de molybdène au milieu de culture cause l'augmentation de la quantité de phosphore organique.

Nous avons donc là un ensemble de données qui plaide en faveur d'une association entre le molybdène et le métabolisme du phosphore. Nous savons peu de chose par contre sur la spécificité d'action du molybdène et nous ignorons à quel stade il intervient.

Il en est de même d'une action possible du molybdène sur le métabolisme de la chlorophylle. Là aussi les données sont insuffisantes pour permettre de conclure à une action directe bien que certaines expériences permettent d'y penser<sup>40</sup>.

Il reste un dernier point à examiner. Le molybdène est-il associé à des systèmes enzymatiques chez les animaux supérieurs ? Nous pouvons répondre affirmativement en ce qui concerne la xanthine-oxydase qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique.

Les expériences de WESTERFELD et RICHERT<sup>123</sup> les menèrent à conclure que la formation d'une quantité normale de xanthine-oxydase dans le foie des jeunes rats dépend d'un facteur alimentaire qui serait en relation avec le groupe prosthétique de cet enzyme. DE RENZO et al.<sup>124</sup> devaient montrer par la suite qu'il s'agit du molybdène qui, ingéré ou injecté, provoque l'augmentation de l'activité enzymatique. Aucun autre élément ne peut remplacer le molybdène dont l'action est donc hautement spécifique. Ces résultats ont également été trouvés par un autre groupe de chercheurs<sup>125</sup>.

La nature métalloflavoprotéique de la xanthine-oxydase, qu'elle soit extraite du lait ou du foie, devait ensuite être démontrée et tous les résultats concordent en ce qui concerne la nature du métal qui est le molyb-

<sup>120</sup> E. J. HEWITT et S. C. AGARWALA, *Nature* 169, 545 (1954).

<sup>121</sup> D. SPENCER, *Aust. J. biol. Sci.* 7, 151 (1954).

<sup>122</sup> J. V. POSSINGHAM, *Aust. J. biol. Sci.* 7, 221 (1954).

<sup>123</sup> W. W. WESTERFELD et D. A. RICHERT, *Science* 109, 68 (1949).

<sup>124</sup> E. C. DE RENZO et al., *J. Am. chem. Soc.* 75, 753 (1953).

<sup>125</sup> D. A. RICHERT et W. W. WESTERFELD, *J. biol. Chem.* 203, 915 (1953).

dène<sup>126-130</sup>; cet élément se retrouve lié à l'enzyme cristallisé<sup>131-134</sup>.

Les préparations purifiées à partir du lait catalysent aussi l'oxydation des aldéhydes et du DPNH et celles qui proviennent du foie également. L'enzyme est donc semblable à bien des points de vue à l'aldéhyde-oxydase du foie<sup>135, 136</sup>.

La xanthine-oxydase intervient dans le catabolisme des purines. Mais elle intervient aussi dans le métabolisme de l'histamine convertissant le  $\beta$ -imidazolyl-acétaldéhyde, qui provient de sa dégradation, en acide imidazolylacétique, produit que l'on trouve dans les urines des mammifères et qui est également formé au cours du métabolisme de l'histidine<sup>137</sup>. L'importance du molybdène pour le métabolisme animal apparaît ainsi clairement.

## VI. Conclusions

Nous avons vu que le molybdène est associé à des processus qui sont d'une importance capitale pour le métabolisme des êtres vivants. Dans certains cas le rôle de cet élément a été relié de façon très précise au fonctionnement de mécanismes essentiels qui intéressent directement l'agriculture et l'économie. Ceci ne signifie nullement que le rôle du molybdène soit limité à ces mécanismes, et il est très possible qu'il intervienne dans d'autres réactions comme certaines données le laissent déjà supposer. Mais quoi que nous réserve l'avenir nous pouvons dès maintenant affirmer qu'il est nécessaire de pouvoir déceler les carences molybdiques afin de pouvoir y remédier. C'est ce qui fera l'objet de la deuxième partie de cette revue<sup>138</sup>.

*Zusammenfassung.* Durch seine Beteiligung an der Reduktion der Nitrate und an der Aufnahme von Stickstoff, spielt das Molybdän eine erhebliche Rolle im Cyclus dieses Elements. Aus diesem Grunde ist es nützlich, diejenigen Stoffwechselprozesse zu kennen, an denen das Molybdän entscheidend beteiligt ist. Es ist das Ziel dieser Übersicht, einen zusammenfassenden

Einblick in den Stand unserer Kenntnisse auf dem Gebiet dieses Oligoelements zu geben; eine chronologische Betrachtung erlaubt uns, zuerst diejenigen biochemischen Vorgänge zu betrachten, für die seine Einwirkung als gesichert gilt.

Die Gesamtheit der Arbeiten über die Nitratreduktion lassen darauf schliessen, dass das Molybdän spezifisch zur Funktion der Nitratreduktase gehört. Indem es integraler Bestandteil der aus Mikroorganismen und höheren Pflanzen extrahierten Nitratreduktase ist, kommt ihm eine Rolle im Elektronentransport, welcher von den Nitraten zu den Nitriten führt, zu. Es handelt sich hier um die erste Stufe der Reaktionen, die zur Ammoniakbildung führen.

Man weiss schon lange, dass Molybdän zur Bindung des Luftstickstoffs benötigt wird. Unsere Kenntnisse über eine spezifische Beteiligung des Elements an diesem Vorgang verdankt man jedoch neueren Arbeiten, vor allem jenen, welche die Bindung von Stickstoff in zellfreien Extrakten zum Gegenstand haben. Diese Ergebnisse werden im Lichte der neuern Theorien über den Mechanismus der Stickstoffbindung besprochen.

Abschliessend werden einige andere Reaktionen des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels betrachtet, an denen das Molybdän Anteil hat.

<sup>126</sup> D. E. GREEN et H. BEINERT, *Biochim. biophys. Acta* **11**, 599 (1953).

<sup>127</sup> J. R. TOTTER et al., *Science* **118**, 555 (1953).

<sup>128</sup> B. MACKLER et al., *J. biol. Chem.* **210**, 149 (1954).

<sup>129</sup> R. K. KIELLEY, *J. biol. Chem.* **216**, 405 (1955).

<sup>130</sup> C. N. REMY et al., *J. biol. Chem.* **217**, 293 (1955).

<sup>131</sup> P. G. AVIS et al., *Nature* **173**, 1230 (1954).

<sup>132</sup> P. G. AVIS et al., *J. chem. Soc.* **1955**, 1100.

<sup>133</sup> P. G. AVIS et al., *J. chem. Soc.* **1956**, 1212.

<sup>134</sup> P. G. AVIS et al., *J. chem. Soc.* **1956**, 1219.

<sup>135</sup> H. R. MAHLER et al., *J. biol. Chem.* **210**, 465 (1954).

<sup>136</sup> J. HURWITZ, *J. biol. Chem.* **212**, 757 (1955).

<sup>137</sup> G. WOLF et al., *J. biol. Chem.* **222**, 159 (1956).

<sup>138</sup> Nos remerciements vont à Monsieur le Professeur AUBEL et aux Drs. THANG et D. J. D. NICHOLAS qui ont bien voulu lire le manuscrit de cette revue et nous faire part de leurs suggestions.